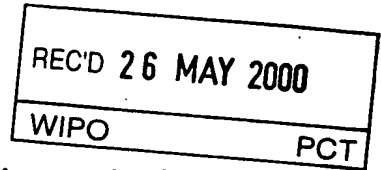


31.03.00

日 本 国 特 許 庁

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

JP00/2080



別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日

Date of Application:

1999年 4月 1日

出 願 番 号

Application Number:

平成11年特許願第095092号

出 願 人

Applicant (s):

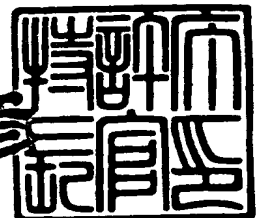
日本たばこ産業株式会社

PRIORITY
DOCUMENTSUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2000年 5月12日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

近 藤 隆 彦



出証番号 出証特2000-3032599

【書類名】 特許願

【整理番号】 990626

【提出日】 平成11年 4月 1日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C12N

【発明者】

 【住所又は居所】 神奈川県横浜市青葉区梅が丘 6 - 2 日本たばこ産業株式会社 経営企画部青葉台駐在內

 【氏名】 謝 志堅

【発明者】

 【住所又は居所】 神奈川県横浜市青葉区梅が丘 6 - 2 日本たばこ産業株式会社 経営企画部青葉台駐在內

 【氏名】 青木 良子

【発明者】

 【住所又は居所】 神奈川県横浜市青葉区梅が丘 6 - 2 日本たばこ産業株式会社 経営企画部青葉台駐在內

 【氏名】 西 義介

【特許出願人】

 【識別番号】 000004569

 【氏名又は名称】 日本たばこ産業株式会社

【代理人】

 【識別番号】 100089705

 【住所又は居所】 東京都千代田区大手町二丁目 2 番 1 号 新大手町ビル 2 0 6 区 ユアサハラ法律特許事務所

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 社本 一夫

 【電話番号】 03-3270-6641

【選任した代理人】

 【識別番号】 100071124

【弁理士】

【氏名又は名称】 今井 庄亮

【選任した代理人】

【識別番号】 100076691

【弁理士】

【氏名又は名称】 増井 忠武

【選任した代理人】

【識別番号】 100075236

【弁理士】

【氏名又は名称】 栗田 忠彦

【選任した代理人】

【識別番号】 100075270

【弁理士】

【氏名又は名称】 小林 泰

【選任した代理人】

【識別番号】 100104477

【弁理士】

【氏名又は名称】 藍原 誠

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 051806

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9814816

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 新規タンパク質、それをコードする遺伝子、及びそれらの利用
法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 (a) 配列表の配列番号 1 に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質；

(b) 配列表の配列番号 1 において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換、付加若しくは挿入されたアミノ酸配列を有し、かつ顆粒球コロニー刺激因子誘導活性を有する抗体またはその一部と結合性を有するタンパク質；または

(c) 配列表の配列番号 1 に記載のアミノ酸配列と少なくとも 5 0 % 以上の相同性を有し、かつ顆粒球コロニー刺激因子誘導活性を有する抗体またはその一部と結合性を有するタンパク質；
をコードする遺伝子。

【請求項 2】 (a) 配列表の配列番号 1 に記載の塩基配列；

(b) 配列表の配列番号 1 において 1 若しくは数個の塩基が欠失、置換、付加若しくは挿入された塩基配列を有し、かつ顆粒球コロニー刺激因子誘導活性を有する抗体またはその一部と結合性を有するタンパク質をコードする塩基配列；または

(c) 配列表の配列番号 1 に記載の塩基配列を有する DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ顆粒球コロニー刺激因子誘導活性を有する抗体またはその一部と結合性を有するタンパク質をコードする塩基配列；
を有する遺伝子。

【請求項 3】 顆粒球コロニー刺激因子誘導活性を有する抗体が寄託番号 FERM BP-6103 を有するハイブリドーマが産生するモノクローナル抗体である、請求項 1 または 2 記載の遺伝子。

【請求項 4】 マウスまたはヒト由来の遺伝子である、請求項 1 から 3 の何れかに記載の遺伝子。

【請求項 5】 (1) 配列表の配列番号 1 に記載の塩基配列において第 5 1 9 番目から第 7 3 6 番目の塩基配列、第 6 6 6 番目から第 6 8 9 番目の塩基配列

、第381番目から第403番目の塩基配列または第709番目から第727番目の塩基配列；

(2) 上記(1)に記載した塩基配列において1若しくは数個の塩基が欠失、置換、付加若しくは挿入された塩基配列；あるいは

(3) 上記(1)に記載した塩基配列の何れかと少なくとも80%の相同性を有する塩基配列；

の何れかを含むDNA断片。

【請求項6】 (1) 配列表の配列番号1に記載の塩基配列において第519番目から第736番目の塩基配列、第666番目から第689番目の塩基配列、第381番目から第403番目の塩基配列または第709番目から第727番目の塩基配列；

(2) 上記(1)に記載した塩基配列において1若しくは数個の塩基が欠失、置換、付加若しくは挿入された塩基配列；あるいは

(3) 上記(1)に記載した塩基配列の何れかと少なくとも80%の相同性を有する塩基配列；

の何れかを含み、顆粒球コロニー刺激因子誘導活性を有する抗体またはその一部と結合性を有するタンパク質をコードする遺伝子。

【請求項7】 下記の何れかのタンパク質：

(a) 配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質；

(b) 配列表の配列番号1において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換、付加若しくは挿入されたアミノ酸配列を有し、かつ顆粒球コロニー刺激因子誘導活性を有する抗体またはその一部と結合性を有するタンパク質；または

(c) 配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列と少なくとも50%以上の相同性を有し、かつ顆粒球コロニー刺激因子誘導活性を有する抗体またはその一部と結合性を有するタンパク質。

【請求項8】 顆粒球コロニー刺激因子誘導活性を有する抗体が寄託番号FERM BP-6103を有するハイブリドーマが産生するモノクローナル抗体である、請求項7記載のタンパク質。

【請求項9】 哺乳動物由来のタンパク質である、請求項7または8記載の

タンパク質。

【請求項 10】 マウスまたはヒト由来のタンパク質である、請求項 9 記載のタンパク質。

【請求項 11】 (1) 配列表の配列番号 1 に記載のアミノ酸配列において、第 1 番目から第 91 番目のアミノ酸配列、第 50 番目から第 146 番目のアミノ酸配列、第 1 番目から第 78 番目のアミノ酸配列、第 200 番目から第 241 番目のアミノ酸配列、第 172 番目から第 241 番目のアミノ酸配列、第 103 番目から第 150 番目のアミノ酸配列、第 169 番目から第 241 番目のアミノ酸配列；

(2) 上記 (1) に記載したアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換、付加若しくは挿入されたアミノ酸配列；あるいは

(3) 上記 (1) に記載したアミノ酸配列の何れかと少なくとも 70% の相同性を有するアミノ酸配列；

の何れかを含むタンパク質。

【請求項 12】 (1) 配列表の配列番号 1 に記載のアミノ酸配列において、第 1 番目から第 91 番目のアミノ酸配列、第 50 番目から第 146 番目のアミノ酸配列、第 1 番目から第 78 番目のアミノ酸配列、第 200 番目から第 241 番目のアミノ酸配列、第 172 番目から第 241 番目のアミノ酸配列、第 103 番目から第 150 番目のアミノ酸配列、第 169 番目から第 241 番目のアミノ酸配列；

(2) 上記 (1) に記載したアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換、付加若しくは挿入されたアミノ酸配列；あるいは

(3) 上記 (1) に記載したアミノ酸配列の何れかと少なくとも 70% の相同性を有するアミノ酸配列；

の何れかを含み、かつ顆粒球コロニー刺激因子誘導活性を有する抗体またはその一部と結合性を有するタンパク質。

【請求項 13】 請求項 7 から 12 の何れかに記載のタンパク質に対する抗体またはその一部。

【請求項 14】 モノクローナル抗体である、請求項 13 記載の抗体または

その一部。

【請求項 1 5】 ヒト型モノクローナル抗体またはヒトモノクローナル抗体である、請求項 1 4 記載の抗体またはその一部。

【請求項 1 6】 請求項 1 から 6 の何れかに記載の遺伝子または DNA 断片を含有する組み換えベクター。

【請求項 1 7】 請求項 1 から 6 の何れかに記載の遺伝子または DNA 断片を含有する組み換えベクターを含む形質転換体。

【請求項 1 8】 請求項 1 から 6 の何れかに記載の遺伝子または DNA 断片または請求項 7 から 1 2 の何れかに記載のタンパク質を含む医薬組成物。

【請求項 1 9】 感染症または好中球減少症の診断、予防または治療のための、請求項 1 8 記載の医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

【発明の属する技術分野】

本発明は、顆粒球コロニー刺激因子誘導活性を有する抗体と反応性を有するタンパク質、それをコードする遺伝子、およびそれらの利用法に関する。

【0 0 0 2】

【従来の技術】

顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF) は、分子量は約 18000 から 22000 で、ヒトの場合 1 7 4 個 (まれに 1 7 8 個)、マウスで 1 7 8 個のアミノ酸で構成されている。血液成分の白血球の一種である好中球の分化増殖を誘導する糖タンパクである。

G-CSF は、成熟好中球の生存の延長や機能の亢進作用を有するが、エリスロポエチンによる赤芽球、インターロイキン 3 による芽球コロニーの形成も増強する。このような G-CSF を産生する細胞としては、マクロファージ、ストローマ細胞、単球、Tリンパ球、繊維芽細胞、血管内皮細胞などが挙げられる。

【0 0 0 3】

G-CSF を薬剤として投与することは、抗ガン剤の副作用としての好中球減少症や骨髓移植後の好中球減少症の治療及び再生不良性貧血の治療に効果を示す。し

かし、投与時においては、血中安定性が低いために頻回投与を必要とし、しかも投与は静脈投与に限られているために患者、医師の双方に苦痛と負担を強いられてきた。さらに、G-CSFを薬剤として投与すると、副作用として骨痛を起こすことが報告されている。また、G-CSFを産生する細胞としてのマクロファージやストローマ細胞を直接投与することは、細胞であるために種々のタンパクや様々な物質を含んでいるために思わぬ副作用を起こす可能性があるため、そのような治療は行われていない。

上記の如く、G-CSF自体を投与することによって好中球を分化増殖させる方法では、副作用として骨痛を惹起することばかりでなく、頻回投与が必要であり、患者及び医師にも苦痛と負担を強いられてきたため、他の治療方法の開発が強く要望されているが、未だ確立されていない。

【0004】

そこで、本発明者らは、G-CSF自体を投与するのではなく、G-CSFを産生させ、好中球を分化増殖させることを意図し、以前に、G-CSF誘導抗体を提供することに成功している（特願平9-266591）。

しかしながら、G-CSF誘導抗体が認識する抗原については今だ解明されていなかった。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】

本発明が解決しようとする課題の一つは、G-CSF誘導抗体の認識する抗原を特定することである。本発明が解決しようとする別の課題は、G-CSF誘導抗体の認識する抗原をコードする遺伝子をクローニングし、同定することである。

【0006】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意研究した結果、G-CSF誘導能を持つモノクローナル抗体をプローブとして使用し、マクロファージ細胞由来のcDNAライブラリーをイムノスクリーニングした結果、3個の陽性クローンの単離に成功し、さらにその塩基配列を決定することにより本発明を提供するに至った。

【0007】

すなわち、本発明によれば、(a) 配列表の配列番号 1 に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質；

(b) 配列表の配列番号 1 において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換、付加若しくは挿入されたアミノ酸配列を有し、かつ顆粒球コロニー刺激因子誘導活性を有する抗体またはその一部と結合性を有するタンパク質；または

(c) 配列表の配列番号 1 に記載のアミノ酸配列と少なくとも 50% 以上の相同性を有し、かつ顆粒球コロニー刺激因子誘導活性を有する抗体またはその一部と結合性を有するタンパク質；

をコードする遺伝子が提供される。

さらに、本発明によれば (a) 配列表の配列番号 1 に記載の塩基配列；

(b) 配列表の配列番号 1 において 1 若しくは数個の塩基が欠失、置換、付加若しくは挿入された塩基配列を有し、かつ顆粒球コロニー刺激因子誘導活性を有する抗体またはその一部と結合性を有するタンパク質をコードする塩基配列；または

(c) 配列表の配列番号 1 に記載の塩基配列を有する DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ顆粒球コロニー刺激因子誘導活性を有する抗体またはその一部と結合性を有するタンパク質をコードする塩基配列；
を有する遺伝子が提供される。

上記において、顆粒球コロニー刺激因子誘導活性を有する抗体は、例えば、寄託番号 FERM BP-6103 を有するハイブリドーマが産生するモノクローナル抗体である。

本発明の遺伝子は例えば、マウスまたはヒト由来の遺伝子である。

【0008】

さらに本発明によれば、(1) 配列表の配列番号 1 に記載の塩基配列において第 519 番目から第 736 番目の塩基配列、第 666 番目から第 689 番目の塩基配列、第 381 番目から第 403 番目の塩基配列または第 709 番目から第 727 番目の塩基配列；

(2) 上記 (1) に記載した塩基配列において 1 若しくは数個の塩基が欠失、置

換、付加若しくは挿入された塩基配列；あるいは

(3) 上記(1)に記載した塩基配列の何れかと少なくとも80%の相同性を有する塩基配列：

の何れかを含むDNA断片が提供される。

【0009】

さらに本発明によれば、(1)配列表の配列番号1に記載の塩基配列において第519番目から第736番目の塩基配列、第666番目から第689番目の塩基配列、第381番目から第403番目の塩基配列または第709番目から第727番目の塩基配列；

(2) 上記(1)に記載した塩基配列において1若しくは数個の塩基が欠失、置換、付加若しくは挿入された塩基配列；あるいは

(3) 上記(1)に記載した塩基配列の何れかと少なくとも80%の相同性を有する塩基配列：

の何れかを含み、顆粒球コロニー刺激因子誘導活性を有する抗体またはその一部と結合性を有するタンパク質をコードする遺伝子が提供される。

【0010】

さらに本発明によれば、下記の何れかのタンパク質：

(a) 配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質；

(b) 配列表の配列番号1において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換、付加若しくは挿入されたアミノ酸配列を有し、かつ顆粒球コロニー刺激因子誘導活性を有する抗体またはその一部と結合性を有するタンパク質；または

(c) 配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列と少なくとも50%以上の相同性を有し、かつ顆粒球コロニー刺激因子誘導活性を有する抗体またはその一部と結合性を有するタンパク質：

が提供される。

上記において、顆粒球コロニー刺激因子誘導活性を有する抗体は、例えば、寄託番号FERM BP-6103を有するハイブリドーマが産生するモノクローナル抗体である。

本発明のタンパク質は好ましくは哺乳動物、例えば、マウスまたはヒト由来の

タンパク質である。

【0011】

さらに本発明によれば、(1)配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列において、第1番目から第91番目のアミノ酸配列、第50番目から第146番目のアミノ酸配列、第1番目から第78番目のアミノ酸配列、第200番目から第241番目のアミノ酸配列、第172番目から第241番目のアミノ酸配列、第103番目から第150番目のアミノ酸配列、第169番目から第241番目のアミノ酸配列；

(2)上記(1)に記載したアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換、付加若しくは挿入されたアミノ酸配列；あるいは

(3)上記(1)に記載したアミノ酸配列の何れかと少なくとも70%の相同性を有するアミノ酸配列；

の何れかを含むタンパク質が提供される。

【0012】

さらに本発明によれば、(1)配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列において、第1番目から第91番目のアミノ酸配列、第50番目から第146番目のアミノ酸配列、第1番目から第78番目のアミノ酸配列、第200番目から第241番目のアミノ酸配列、第172番目から第241番目のアミノ酸配列、第103番目から第150番目のアミノ酸配列、第169番目から第241番目のアミノ酸配列；

(2)上記(1)に記載したアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換、付加若しくは挿入されたアミノ酸配列；あるいは

(3)上記(1)に記載したアミノ酸配列の何れかと少なくとも70%の相同性を有するアミノ酸配列；

の何れかを含み、かつ顆粒球コロニー刺激因子誘導活性を有する抗体またはその一部と結合性を有するタンパク質が提供される。

【0013】

さらに本発明によれば、上記した本発明のタンパク質に対する抗体またはその一部が提供される。抗体は好ましくはモノクローナル抗体であり、特に好ましく

はヒト型モノクローナル抗体またはヒトモノクローナル抗体である。

【0014】

さらに本発明によれば、本発明の遺伝子またはDNA断片を含有する組み換えベクターが提供される。

さらに本発明によれば、本発明の遺伝子またはDNA断片を含有する組み換えベクターを含む形質転換体が提供される。

さらに本発明によれば、本発明の遺伝子、DNA断片またはタンパク質を含む医薬組成物（特には、感染症または好中球減少症の診断、予防または治療のための医薬組成物）が提供される。

【0015】

【発明の実施の形態】

以下において、本発明の実施態様および実施方法について詳細に説明する。

本発明に先だち、本発明者らは、マクロファージ自体を免疫して抗体を取得し、得られた抗体の中からG-CSFを誘導する抗体の単離に成功している（特願平9-266591；この明細書に記載の内容は全て引用により本明細書中に取り込まれるものとする）。本発明の遺伝子は、この抗体をプローブとして用いてマウスマクロファージ由来のcDNAライブラリーをスクリーニングすることによって単離されたものであり、本発明の遺伝子によりコードされるタンパク質は、顆粒球コロニー刺激因子誘導活性を有する抗体またはその一部と結合性を有することを特徴とする。

先ず、本明細書で言う「顆粒球コロニー刺激因子誘導活性を有する抗体またはその一部」（本明細書中以下において、「本発明で用いる抗体」とも称する）について、その入手方法などについて説明する。

【0016】

本発明者らは、まず、マウスマクロファージ細胞株を免疫原としてMRL/lprマウス（自己免疫疾患マウス）に投与し、モノクローナル抗体の単離を行った。次いで、得られたモノクローナル抗体を、免疫原細胞であるマウスマクロファージ細胞株に作用させ、該抗体の免疫原細胞に与える影響を検討した結果、得られた抗体の一つが免疫原細胞株であるマウスマクロファージ細胞株から濃度依存的に

G-CSFを産生させる特性を有することを見い出した（この抗体を産生するハイブリドーマは国際寄託番号FERM BP-6103として寄託されている）。

本明細書中で「モノクローナル抗体」とは、マクロファージ細胞株に反応性を有するモノクローナル抗体であり、具体的には、G-CSFを産生させる作用を有するモノクローナル抗体である。

【0017】

本発明で用いる抗体は、マクロファージ細胞株に実質的に結合するという特性を有する。本発明で用いる抗体には、上記性質を有するポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体を共に包含する。また、「モノクローナル抗体」には、IgG、IgM、IgA、IgDおよびIgEなるいずれのイムノグロブリンクラスに属するモノクローナル抗体をも包含し、好適には、IgGまたはIgMイムノグロブリンクラスモノクローナル抗体である。

【0018】

なお、マクロファージ細胞株は、例えば、自然発生の白血病細胞から調製したり、白血病ウイルスによる形質転換から調製することが可能である。

本発明で用いる抗体は常法（例えば、文献「続生化学実験講座5、免疫生化学研究法、日本生化学会編：東京化学同人発行、等」に記載の方法）に従って取得することができる。

本発明で用いるモノクローナル抗体は、いわゆる細胞融合によって製造されるハイブリドーマ（融合細胞）から製造することができる。すなわち、抗体産生細胞と骨髓腫系細胞から融合ハイブリドーマを形成し、当該ハイブリドーマをクローン化し、マクロファージ細胞株の全部または一部を抗原として、それに対して特異的親和性を示す抗体を生産するクローンを選択することによって製造される。その操作は免疫抗原としてマクロファージ細胞株の全部または一部を使用する以外は、従来既知の手段を用いることができる。

【0019】

免疫抗原は、例えばマクロファージ細胞株そのものを用いるか、マクロファージ細胞株の膜画分若くは溶解抽出液の全部または一部を有する（ポリ）ペプチドの溶液又は例えば完全フロインドアジュバンドとを混和して調製される。免疫の

対象として用いられる動物としては、マウス、ラット、モルモット、ハムスターまたはウサギ等の哺乳動物、好ましくはマウスまたはラット、より好ましくはマウスが例示される。免疫は、これらの哺乳動物の皮下内、筋肉内、静脈内、フットパッド内、または腹腔内に1乃至数回注射することにより行われる。

通常、初回免疫から約1～2週間毎に1～4度免疫を行い、さらに約1～4週間後に最終免疫を行って、最終免疫より約3～5日後に免疫感作された動物から抗体産生細胞が採取される。

【0020】

本発明で用いるモノクローナル抗体には、「国際寄託番号 FERM BP-6103」のハイブリドーマが産生するモノクローナル抗体（3-4H7抗体）もしくはその一部または該抗体と実質的に同一の性状を有する抗体が含まれる。「3-4H7抗体」は、細胞からのG-CSF産生誘導能を有する。

本発明で用いるモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマは、公知の方法で調製することが可能である。公知の方法としては、例えば、モノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマの調製には、ケーラー及びミルシュタインらの方法（Nature, Vol. 256, pp. 495-497, 1975）及びそれに準じる修飾方法が挙げられる。すなわち、モノクローナル抗体は、前述の如く免疫感作された動物から取得される脾臓、リンパ節、骨髄あるいは扁桃等、好ましくは脾臓に含まれる抗体産生細胞と、好ましくは同種のマウス、ラット、モルモット、ハムスター、ウサギまたはヒト等の哺乳動物、より好ましくはマウス、ラットまたはヒトの骨髄腫系細胞（ミエローマ）との融合により得られる融合細胞（ハイブリドーマ）を培養することにより調製される。培養は、インビトロ、またはマウス、ラット、モルモット、ハムスターもしくはウサギ等の哺乳動物、好ましくはマウスまたはラット、より好ましくはマウスの腹水中等でのインビボで行うことができ、抗体はそれぞれ該培養上清、または哺乳動物の腹水から取得することができる。

【0021】

細胞融合に用いられる骨髄腫系細胞としては、例えばマウス由来ミエローマ「P3/X63-AG8」、「P3/NSI/1-Ag4-1」、「P3/X63-Ag8.U1」、「SP2/0-Ag14」、「PAI」、「FO」または「BW5147」、ラット由来ミエローマ「210RCY3-Ag1.2.3」、

ヒト由来ミエローマ「U-266AR1」、「GM1500-6TG-A1-2」、「UC729-6」、「CEM-AGR」、「DIR11」又は「CEM-T15」などを挙げる事ができる。

【0022】

本発明で用いるモノクローナル抗体を産生する融合細胞クローンのスクリーニングは、融合細胞を、例えばマイクロタイタープレート中で培養し、増殖の見られたウェルの培養上清の抗原に対する反応性を、例えば、フローサイトメトリー、RIAやELISA等の酵素抗体法によって測定することにより行うことができる。

基本培地としては、例えば、Ham' F12培地、MCDB153培地あるいは低カルシウムMEM培地などの低カルシウム培地、MCDB104培地、MEM培地、D-MEM培地、RPMI 1640培地、ASF104培地、RD培地などの高カルシウム培地などが挙げられる。該基本培地には、目的に応じて、例えば、血清、ホルモンサイトカインおよび／または各種の無機または有機物質などを含有させることができる。モノクローナル抗体の単離、精製は上述の培養上清または腹水を飽和硫酸アンモニウム、ユーグロブリン沈殿法、カプロイン酸法、カプリル酸法、イオン交換クロマトグラフィー（DEAEまたはDE52など）、抗イムノグロブリンカラムあるいはプロテインA若くはプロテインGカラム等のアフィニティーカラムクロマトグラフィーに付すること、疎水クロマトグラフィーに付することなどにより行うことができる。

【0023】

本発明で用いるモノクローナル抗体は、上述の製造方法に限定されることなく、いかなる方法で得られたものであってもよい。また、通常「モノクローナル抗体」は、免疫感作を施す哺乳動物の種類によりそれぞれ異なる構造の糖鎖を有するが、本発明で用いる「モノクローナル抗体」は該糖鎖の構造差異により限定されるものではなく、あらゆる哺乳動物由来のモノクローナル抗体をも包含するものである。ファージディスプレイでつくられるモノクローナル抗体、さらに、例えばヒトイムノグロブリン遺伝子を組み込むことにより、ヒト型抗体を産生するように遺伝子工学的に作出されたトランスジェニックマウスを用いて得られるヒト型モノクローナル抗体、あるいは、遺伝子組換え技術により、ある哺乳動物由来のモノクローナル抗体の定常領域（Fc領域）をヒトモノクローナル抗体のFc領

域と組み換えたキメラモノクローナル抗体、さらには抗原と相補的に直接結合し得る相補性決定部位 (CDR: complementarity-determining residue) 以外、全領域をヒトモノクローナル抗体の対応領域と組換えたヒト化モノクローナル抗体も本発明で用いる「モノクローナル抗体」に包含される。

【0024】

また、本発明においては「抗体の一部」を使用してもよく、ここで言う、「抗体の一部」とは、少なくとも一つの可変領域を含有する抗体フラグメントの意であり、具体的にはFv、F(ab')₂、Fab'あるいはFabを指す。ここで、「F(ab')₂」及び「Fab'」とは、イムノグロブリン (モノクローナル抗体) をタンパク質分解酵素であるペプシンあるいはパパイン等で処理することにより製造され、ヒンジ領域中の2本のH鎖間に存在するジスルフィド結合の前後で消化されて生成される抗体フラグメントを意味する。例えば、IgGをパパインで処理すると、ヒンジ領域中の2本のH鎖間に存在するジスルフィド結合の上流で切断されてVL (L鎖可変領域) とCL (L鎖定常領域) からなるL鎖、及びVH (H鎖可変領域) とCH_γ1 (H鎖定常領域中の_γ1領域) とからなるH鎖フラグメントがC末端領域でジスルフィド結合により結合した相同な2つの抗体フラグメントを製造することができる。これら2つの相同な抗体フラグメントをそれぞれFab'という。また、IgGをペプシンで処理すると、ヒンジ領域中の2本のH鎖間に存在するジスルフィド結合の下流で切断されて前記2つのFab'がヒンジ領域でつながったものよりやや大きい抗体フラグメントを製造することができる。この抗体フラグメントをF(ab')₂という。

【0025】

本発明の遺伝子によりコードされるタンパク質は、上記詳述したような顆粒球コロニー刺激因子誘導活性を有する抗体またはその一部と結合性を有することを特徴とする。本明細書中で言う「結合性」とは、タンパク質と抗体との間の通常の結合性を意味し、慣用的な免疫学的分析法 (例えば、免疫沈降法、ELISA法、イムノブロット法など) を用いて測定できる。

【0026】

本発明は、配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質またはそれと相同性を有するタンパク質をコードする遺伝子を提供する。本発明はま

た、配列表の配列番号 1 に記載の塩基配列またはそれと相同性を有する塩基配列を有する遺伝子を提供する。

【0027】

本発明の遺伝子の種類は特に限定されず、天然由来の DNA、組み換え DNA、化学合成 DNA の何れでもよく、またゲノミック DNA クローン、cDNA クローンの何れでもよい。

【0028】

本発明の遺伝子は典型的には、配列表の配列番号 1 に記載の塩基配列を有するが、これは本発明の一例を示すにすぎない下記の実施例で得られたクローン (MR 19) の塩基配列である。天然の遺伝子の中にはそれを生産する生物種の品種の違いや、生態系の違いに起因する少数の変異やよく似たアイソザイムの存在に起因する少数の変異が存在することは当業者に周知である。従って、本発明の遺伝子は、配列表の配列番号 1 に記載の塩基配列を有する遺伝子のみに限定されるわけではなく、本明細書に記載した特徴を有するタンパク質をコードする全ての遺伝子を包含する。

【0029】

特に、本明細書により本発明のタンパク質のアミノ酸配列およびそれをコードする DNA 配列が開示されれば、この配列またはその一部を利用して、ハイブリダイゼーションや、PCR という遺伝子工学の基本的手法を用いて、他の生物種から同様の生理活性を有するタンパク質をコードする遺伝子を容易に単離することができる。このような場合、そのような遺伝子も本発明の範囲に含まれる。

【0030】

相同遺伝子のスクリーニングのために使用するハイブリダイゼーションの条件は特に限定されず、目的の相同遺伝子とプローブとの相同性の度合いなどにより当業者ならば適宜選択することができるが、一般的にはストリンジントな条件が好ましく、例えば、 $6 \times \text{SSC}$ [0.9M の NaCl、0.09M のクエン酸ナトリウム (pH 7.0)]、 $5 \times \text{デンハルト (Denhardt's) 溶液}$ [1000 mL 中に 1 g フィコール、1 g ポリビニルピロリドン、1 g BSA]、0.5% SDS、 $25^{\circ}\text{C} \sim 68^{\circ}\text{C}$ (例えば 37°C 、 42°C または 68°C) ; あるいは $0 \sim 5$

0%ホルムアミド、6×SSC、0.5%SDS、25～68℃（例えば37℃、42℃または68℃）などのハイブリダイゼーション条件を使用することが考えられる。ホルムアミド濃度、デンハルト溶液濃度、塩濃度及び温度などのハイブリダイゼーション条件を適宜設定することによりある一定の相同性以上の相同性を有する塩基配列を含むDNAをクローニングできることは当業者に周知であり、このようにしてクローニングされた相同遺伝子は全て本発明の範囲の中に含まれる。

上記のようなハイブリダイゼーションを使用してクローニングされる相同遺伝子は、配列表の配列番号1に記載の塩基配列に対して少なくとも70%以上、好ましくは80%以上、より好ましくは90%以上、特に好ましくは95%以上、最も好ましくは98%以上の相同性を有する。

【0031】

本発明は、配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質またはそれと相同性を有するタンパク質を提供する。

本発明の配列番号1に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質は、それをコードする遺伝子を適当な発現ベクターに組み込み、それを適当な宿主に形質転換して組み換えタンパク質を発現させることによって得ることができる。しかしながら、本発明のタンパク質は、本明細書に記載した特徴を有する限り、その起源、製法などは限定されず、天然産のタンパク質、遺伝子工学的手法により組換えDNAから発現させたタンパク質、あるいは化学合成タンパク質の何れでもよい。

【0032】

本発明のタンパク質は典型的には、配列表の配列番号1に記載の241個のアミノ酸配列を有する。しかし、天然のタンパク質の中にはそれを生産する生物種の品種の違いや、生態型の違いによる遺伝子の変異、あるいはよく似たアイソザイムの存在などに起因して1から複数個のアミノ酸変異を有する変異タンパク質が存在することは周知である。なお、ここで言う「アミノ酸変異」とは、1以上のアミノ酸の置換、欠失、挿入及び／又は付加などを意味する。本発明のタンパク質は、クローニングされた遺伝子の塩基配列からの推測に基づいて、配列番号1に記載のアミノ酸配列を有するが、その配列を有するタンパク質のみに限定さ

れるわけではなく、本明細書中に記載した特性を有する限り全ての相同タンパク質を含むことが意図される。相同性は少なくとも50%以上、好ましくは60%以上、より好ましくは70%以上、さらに好ましくは80%以上、さらに好ましくは90%以上、特に好ましくは95%以上、最も好ましくは98%以上である。

【0033】

一般的に、同様の性質を有するアミノ酸同士の置換（例えば、疎水性アミノ酸同士の置換、親水性アミノ酸同士の置換、酸性アミノ酸同士の置換または塩基性アミノ酸同士の置換）を導入した場合、得られる変異タンパク質は元のタンパク質と同様の性質を有することが多い。遺伝子組換え技術を使用して、このような所望の変異を有する組換えタンパク質を作製する手法は当業者に周知であり、このような変異タンパク質も本発明の範囲に含まれる。

【0034】

本明細書の以下の実施例では本発明の一例を示すものとして、マウスマクロファージ由来のcDNAのクローニングが示されている。本明細書中に開示されたタンパク質のアミノ酸配列およびそれをコードする遺伝子の配列（マウス由来）またはその一部を利用して、ハイブリダイゼーションまたはPCRなどの遺伝子工学的手法を用いて、他の起源などから同様の生理活性を有するタンパク質をコードする遺伝子を単離することは当業者の通常の知識の範囲内のことであり、そのようにして単離された遺伝子によりコードされるタンパク質も本発明の範囲に含まれる。

【0035】

例えば、本発明の遺伝子およびタンパク質に関してヒト由来のホモログを得るための方法の一例としては、以下の方法が挙げられる。

ヒトマクロファージ系細胞株（THP-1、U937、HL-60）から、グアニジウムチオシアネート／フェノールクロロホルム・シングルステップ抽出法（ラボマニュアル遺伝子工学、第3版、第83～84頁、1996）によって、全RNAを抽出し、オリゴ（dT）セルロースカラムを用いて精製して、ポリA⁺RNAを得る。逆転写酵素（MMLV-RTase）とDNAポリメラーゼを

用いて二本鎖 cDNA を合成する。この二本鎖 cDNA を用いて、Gubler-Hoffmann の方法 (Gubler, U. 及び Hoffmann, B., J.: Gene, 25: 263-269, 1983) によって、 λ ZAP II ファージベクターを用いて cDNA ライブラリーを構築する。本明細書に開示したマウス cDNA (MMR 19 クローン) の塩基配列 (配列番号 1) の中でヒトと高い相同性を有する領域 (例えば、ヒトと 91% の相同性が認められた配列番号 1 中の 172 番目から 241 番目の領域) 内の配列を増幅できるプライマーを用いてヒトマクロファージ細胞の cDNA ライブラリーを鋳型として増幅させた DNA 配列をプローブとして、あるいはこの領域 (例えば、配列番号 1 中の 172 番目から 241 番目の領域) を直接プローブとして用いて、ヒトマクロファージ細胞の cDNA ライブラリーをスクリーニングすることによって目的タンパク質の全長をコードする cDNA を単離する。Primer Walking 法によって、cDNA の塩基配列を解析する。目的タンパク質の全長をコードすることが確認された cDNA をバキュロウイルスに導入し、タンパク質として発現させ、アフィニティカラムによりタンパク質を精製することによりヒト型ホモログタンパク質を得ることができる。

【0036】

上記したように、本発明は、配列番号 1 に記載の塩基配列またはアミノ酸配列番号を有する遺伝子とタンパク質、並びにこれらと相同性を有する遺伝子とタンパク質に関するものである。本発明により提供される配列番号 1 に記載の塩基配列およびアミノ酸配列と相同性を有する配列が、他の生物中にも存在するか否かを検索した結果、ヒトの EST (expressed sequence tag) の中に本発明の遺伝子と相同性の高いものが存在することが確認された (以下の実施例 3 を参照)。従って、このような本発明の塩基配列と高い相同性を有するヒト由来の EST をプローブとして用いてヒト由来の遺伝子ライブラリー (cDNA ライブラリーなど) をスクリーニングすることによっても、ヒト由来のホモログ遺伝子を単離できることは明らかである。

【0037】

上記した通り、本発明の配列番号 1 に記載の塩基配列の一部分 (即ち、DNA 断片) が、ヒトにおいても高い相同性を有して保存されていることがデータベース

検索の結果、明らかとなった。このようなDNA断片は、上記したようにヒト由来のホモログ遺伝子をスクリーニングする際のプローブとして有用であり、本発明の一側面を形成する。そのようなDNA断片としては、配列表の配列番号1に記載の塩基配列において第519番目から第736番目の塩基配列、第666番目から第689番目の塩基配列、第381番目から第403番目の塩基配列または第709番目から第727番目の塩基配列の何れかを含むDNA断片が挙げられ、さらにこれらの何れかにおいて1若しくは数個の塩基が欠失、置換、付加若しくは挿入された塩基配列；またはこれらの何れかと少なくとも80%、好ましくは85%以上、より好ましくは90%以上、さらに好ましくは95%以上、最も好ましくは98%以上の相同性を有する塩基配列を含むDNA断片も本発明の範囲内である。

【0038】

また、本発明の配列番号1記載のアミノ酸配列の一部が、ヒトにおいても高い相同性を有して保存されていることがデータベース検索の結果、明らかとなった。このような本発明のタンパク質の一部から成るタンパク質断片は、本発明のタンパク質と同様、G-C-S-F誘導活性を有する抗体の分析または単離のための試薬として有用であり、また本発明のタンパク質と同様、医薬としても有用である可能性があり、本発明の一側面を形成する。

このようなタンパク質としては、配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列において、第1番目から第91番目のアミノ酸配列、第50番目から第146番目のアミノ酸配列、第1番目から第78番目のアミノ酸配列、第200番目から第241番目のアミノ酸配列、第172番目から第241番目のアミノ酸配列、第103番目から第150番目のアミノ酸配列、第169番目から第241番目のアミノ酸配列の何れかを含むタンパク質が挙げられ、さらにこれらの何れかにおいて1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換、付加若しくは挿入されたアミノ酸配列；またはこれらの何れかと少なくとも70%、好ましくは80%以上、より好ましくは85%以上、さらに好ましくは90%以上、さらに好ましくは95%以上、最も好ましくは98%以上の相同性を有するアミノ酸配列の何れかを含むタンパク質も本発明の範囲内である。

【0039】

本発明は、上記した本発明のタンパク質に対する抗体（本明細書中以下において、「本発明のモノクローナル抗体」とも称される）を提供する。以下、本発明の抗体の実施態様および入手方法について詳細に説明する。

本発明の抗体はポリクローナル抗体でもモノクローナル抗体でもよく、モノクローナル抗体の場合にはキメラ抗体でもよく、特にマウス／ヒトキメラ抗体が好ましい。「モノクローナル抗体」には、IgG、IgM、IgA、IgDおよびIgEなるいずれのイムノグロブリンクラスに属するモノクローナル抗体をも包含し、好適には、IgGまたはIgMイムノグロブリンクラスモノクローナル抗体である。

【0040】

本発明のポリクローナル抗体（抗血清）あるいはモノクローナル抗体などの抗体は常法（例えば、文献「続生化学実験講座5、免疫生化学研究法、日本生化学会編：東京化学同人発行、等」に記載の方法）に従って取得することができる。

即ち、例えば、抗原を必要に応じてフロイントアジュバンド（Freund's Adjuvant）とともに、哺乳動物、好ましくはマウス、ラット、ハムスター、モルモット、ウサギ、イヌ、ネコ、ブタ、ヤギ、ウマあるいはウシ、より好ましくはマウス、ラット、ハムスター、モルモットまたはウサギに免疫する。ポリクローナル抗体は、該免疫感作動物から得た血清から取得することができる。また、モノクローナル抗体は、該免疫感作動物から得た該抗体産生細胞と自己抗体産生能のない骨髓腫系細胞（ミエローマ細胞）からハイブリドーマを調製し、該ハイブリドーマをクローン化し、哺乳動物の免疫に用いた抗原に対して特異的親和性を示すモノクローナル抗体を産生するクローンを選択することにより製造することができる。

【0041】

モノクローナル抗体は、具体的には以下のようにして製造することができる。即ち、本発明のタンパク質あるいは本発明のタンパク質を発現している細胞等を免疫原として用い、必要に応じてフロイントアジュバンド（Freund's Adjuvant）とともに、マウス、ラット、ハムスター、モルモットまたはウサギ、好ましくはマウス、ラットまたはハムスター（これらの動物にはヒト抗体産生トランスジェ

ニックマウスのような他の動物由来の抗体を産生するように作出されたトランスジェニック動物を含む)の皮下内、筋肉内、静脈内、フットパッド内または腹腔内に1乃至数回注射するか、あるいは移植することにより免疫感作を施す。通常、初回免疫から約1日乃至14日毎に1乃至4回免疫を行って、最終免疫より約1乃至5日後に免疫感作された該哺乳動物から抗体産生細胞が取得される。

【0042】

本発明のモノクローナル抗体は、いわゆる細胞融合によって製造されるハイブリドーマ(融合細胞)から製造することができる。

モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマは、公知の方法で調製することが可能である。公知の方法としては、ケーラー及びミルシュタインらの方法(Nature, Vol. 256, pp. 495-497, 1975)及びそれに準じる修飾方法が挙げられる。すなわち、本発明のモノクローナル抗体は、前述の如く免疫感作された動物から取得される脾臓、リンパ節、骨髄あるいは扁桃等、好ましくは脾臓に含まれる抗体産生細胞と、好ましくは同種のマウス、ラット、モルモット、ハムスター、ウサギまたはヒト等の哺乳動物、より好ましくはマウス、ラットまたはヒト由来の骨髄腫系細胞(ミエローマ)との融合により得られる融合細胞(ハイブリドーマ)を培養することにより調製される。

【0043】

細胞融合に用いられる骨髄腫系(ミエローマ)細胞としては、例えばマウス由来ミエローマ「P3/X63-AG8」、「P3/NSI/1-Ag4-1」、「P3/X63-Ag8.U1」、「SP2/0-Ag14」、「X63,653」、「PAI」、「F0」または「BW5147」、ラット由来ミエローマ「210RCY3-Ag1.2.3」、ヒト由来ミエローマ「U-266AR1」、「GM1500-6TG-A1-2」、「UC729-6」、「CEM-AGR」、「D1R11」又は「CEM-T15」などを挙げる事ができる。

本発明のモノクローナル抗体を産生する融合細胞クローンのスクリーニングは、融合細胞を、例えばマイクロタイタープレート中で培養し、増殖の見られたウェルの培養上清の抗原に対する反応性を、例えば、フローサイトメトリー、RIAやELISA等によって測定することにより行うことができる。

【0044】

ハイブリドーマからのモノクローナル抗体の製造は、ハイブリドーマをインビトロ、またはマウス、ラット、モルモット、ハムスターまたはウサギなど、好ましくはマウスまたはラット、より好ましくはマウスの腹水中などでのインビボで行い、得られた培養上清、または哺乳動物の腹水から単離することにより行うことができる。インビトロで培養する場合には、培養する細胞種の特性、試験研究の目的及び培養方法などの種々の条件に合わせて、ハイブリドーマを増殖、維持および保存させ、培養上清中にモノクローナル抗体を産生させるために用いられるような既知栄養培地あるいは既知の基本培地から誘導調製されるあらゆる栄養培地を用いて実施することが可能である。

【0045】

基本培地としては、例えば、Ham' F12培地、MCDB153培地あるいは低カルシウムMEM培地などの低カルシウム培地、MCDB104培地、MEM培地、D-MEM培地、RPMI 1640培地、ASF 104培地、RD培地などの高カルシウム培地などが挙げられる。該基本培地には、目的に応じて、例えば、血清、ホルモンサイトカインおよび／または各種の無機または有機物質などを含有させることができる。モノクローナル抗体の単離、精製は上述の培養上清または腹水を飽和硫酸アンモニウム、ユーグロブリン沈殿法、カプロイン酸法、カプリル酸法、イオン交換クロマトグラフィー（DEAEまたはDE52など）、抗イムノグロブリンカラムあるいはプロテインA若くはプロテインGカラム等のアフィニティーカラムクロマトグラフィーに付すること、疎水クロマトグラフィーに付することなどにより行うことができる。

【0046】

本発明における「キメラ抗体」は、遺伝子工学的に作製されるモノクローナル抗体であって、具体的には、例えば、その可変領域がマウスイムノグロブリン由来の可変領域であって、かつその定常領域がヒトイムノグロブリン由来の定常領域であることを特徴とするマウス／ヒトキメラモノクローナル抗体などのキメラモノクローナル抗体を意味する。ヒトイムノグロブリン由来の定常領域は、IgG、IgM、IgA、IgD及びIgEなどのアイソタイプにより各々固有のアミノ酸配列を有するが、本発明における組換えキメラモノクローナル抗体の定常

領域はいずれのアイソタイプに属するヒトイムノグロブリンの定常領域であってもよい。好ましくは、ヒトIgGの定常領域である。本発明におけるキメラモノクローナル抗体は、例えば、以下のようにして製造することができる。しかしながら、そのような製造方法に限定されるものではないことは言うまでもない。

【0047】

例えば、マウス／ヒトキメラモノクローナル抗体は、実験医学（臨時増刊号）、第1.6巻、第10号、1988年および特公平3-73280号公報等を参照しながら作製することができる。即ち、マウスモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマから単離した該モノクローナル抗体をコードするDNAから取得した活性名 V_H 遺伝子（H鎖可変領域をコードする再配列されたVDJ遺伝子）の下流にヒトイムノグロブリンをコードするDNAから取得した C_H 遺伝子（H鎖定常領域をコードするC遺伝子）を、また該ハイブリドーマから単離したマウスモノクローナル抗体をコードするDNAから取得した活性な V_L 遺伝子（L鎖可変領域をコードする再配列された V_J 遺伝子）の下流にヒトイムノグロブリンをコードするDNAから取得した C_L 遺伝子（L鎖定常領域をコードするC遺伝子）を、各々発現可能なように配列して1つ又は別々の発現ベクターに挿入し、該発現ベクターで宿主細胞を形質転換し、該形質転換細胞を培養することにより作製することができる。

【0048】

具体的には、まず、マウスモノクローナル抗体産生ハイブリドーマから常法によりDNAを抽出後、該DNAを適切な制限酵素（例えばEcoRI、Hind III等）を用いて消化し、電気泳動に付して（例えば0.7%アガロースゲル使用）サザンブロット法を行なう。泳動したゲルを例えばエチジウムブロマイド等で染色し、写真撮影後、マーカーの位置を付し、ゲルを2回水洗し、0.25MのHCl溶液に15分浸す。次いで、0.4NのNaOH溶液に10分間浸し、その間緩やかに振盪する。常法により、フィルターに移し、4時間後フィルターを回収して2×SSCで2回洗浄する。フィルターを十分乾燥した後、ペイキング（75℃、3時間）を行なう。ペイキング終了後に、該フィルターを0.1×SSC／0.1%SDS溶液に入れ、65℃で30分間処理する。次いで、3×SSC／0.1%SDS溶液に浸す。得られたフィルターをプレハイブリダイゼーション液と共にビニール

袋に入れる。65℃で3～4時間処理する。

【0049】

次に、この中に³²P標識したプローブDNA及びハイブリダイゼーション液を入れ、65℃で12時間程反応させる。ハイブリダイゼーション終了後、適切な塩濃度、反応温度及び時間（例えば、2×SSC、0.1% SDS溶液、室温、10分間）のもとで、フィルターを洗う。該フィルターをビニール袋に入れ、2×SSCを少量加え、密封し、オートラジオグラフィーを行なう。上記サザンブロット法により、マウスモノクローナル抗体のH鎖及びL鎖を各々コードする再配列されたVDJ遺伝子及びVJ遺伝子を同定する。同定したDNA断片を含む領域をショ糖密度勾配遠心にて分画し、ファージベクター（例えば、charon4A、charon28、λEMBL3、λEMBL4等）に組込み、該ファージベクターで大腸菌（例えば、LE392、NM539等）を形質転換し、ゲムノライブラリーを作製する。そのゲムノライブラリーを適当なプローブ（H鎖J遺伝子、L鎖（κ）J遺伝子等）を用いて、例えばベントンディビス法（サイエンス(Science)、第196巻、第180～第182頁（1977））に従って、ブランクハイブリダイゼーションを行い、再配列されたVDJ遺伝子或いはVJ遺伝子を各々含むポジティブクローンを得る。得られたクローンの制限酵素地図を作成し、塩基配列を決定し、目的とする再配列されたV_H(VDJ)遺伝子或いはV_L(VJ)遺伝子を含む遺伝子が見られていることを確認する。

一方、キメラ化に用いるヒトC_H遺伝子及びヒトC_L遺伝子を別に単離する。例えば、ヒトIgG1とのキメラ抗体を作製する場合には、C_H遺伝子であるC_γ1遺伝子とC_L遺伝子であるC_κ遺伝子を単離する。これらの遺伝子はマウス免疫グロブリン遺伝子とヒト免疫グロブリン遺伝子の塩基配列の高い相同性を利用してヒトC_γ1遺伝子及びヒトC_κ遺伝子に相当するマウスC_γ1遺伝子及びマウスC_κ遺伝子をプローブとして用い、ヒトゲノムライブラリーから単離することによって得ることができる。

【0050】

具体的には、例えば、クローンIg146（プロシーディングスナショナルアカデミーオブサイエンス）（Proc.Natl.Acad.Sci.USA）第75巻、第4709～第

4713頁(1978))からの3kbのHindIII-Bam HI断片とクローンMEP10 (プロシーディングスナショナルアカデミーオブサイエンス) (Proc.Natl.Acad.Sci.USA)第78巻、第474～第478頁(1981))からの6.8kbのEcoRI断片をプローブとして用い、ヒトの λ Charon4AのHaeIII-AluIゲムノライブラリー (セル (Cell)、第15巻、第1157～1174頁(1978))の中からヒト κ 遺伝子を含み、エンハンサー領域を保持しているDNA断片を単離する。また、ヒトC γ 1遺伝子は、例えば、ヒト胎児肝細胞DNAをHindIIIで切断し、アガロースゲル電気泳動で分画した後、5.9kbのバンドを λ 788に挿入し、前記のプローブを用いて単離する。

【0051】

このようにして得られたマウスV $_H$ 遺伝子とマウスV $_L$ 遺伝子、及びヒトC $_H$ 遺伝子とマウスC $_L$ 遺伝子を用いて、プロモーター領域及びエンハンサー領域などを考慮しながらマウスV $_H$ 遺伝子の下流にヒトC $_H$ 遺伝子を、またマウスV $_L$ 遺伝子の下流にヒトC $_H$ 遺伝子を、適切な制限酵素及びDNAリガーゼを用いて、例えば、pSV2gpt或いはpSV2neo等の発現ベクターに常法に従って組込む。この際、マウスV $_H$ 遺伝子/ヒトC $_H$ 遺伝子とマウスV $_L$ 遺伝子/ヒトC $_L$ 遺伝子のキメラ遺伝子は、一つの発現ベクターに同時に配置されてもよいし、各々別個の発現ベクターに配置することもできる。

このようにして作製したキメラ遺伝子挿入発現ベクターを、例えばP3X63・Ag8・653細胞或いはSP210細胞といった、自らは抗体を産生していない骨髓腫細胞にプロトプラスト融合法、DEAE-デキストラン法、リン酸カルシウム法或いはエレクトロポレーション法等により導入する。形質転換細胞は、発現ベクターに導入された薬物耐性遺伝子に対応する薬物含有培地中での培養により選別し、目的とするキメラモノクローナル抗体産生細胞を取得する。このようにして選別された抗体産生細胞の培養上清中から目的のキメラモノクローナル抗体を取得する。

【0052】

本発明における「ヒト型抗体 (CDR-grafted抗体)」は、遺伝子工学的に作製されるモノクローナル抗体であって、具体的には例えば、その超可変領域の相補性決定領域の一部又は全部がマウスモノクローナル抗体に由来する超可変領域の

相補性決定領域であり、その可変領域の枠組領域がヒトイムノグロブリン由来の可変領域の枠組領域であり、かつその定常領域がヒトイムノグロブリン領域であることを特徴とするヒト型モノクローナル抗体を意味する。

【0053】

ここで、超可変領域の相補性決定領域とは、抗体の可変領域中の超可変領域に存在し、抗原と相補的に直接結合する部位である3つの領域 (CDR: complementarity-determining region; CDR1、CDR2、CDR3) を指し、また可変領域の枠組領域とは、該3つの相補性決定領域の前後に介在する比較的保存された4つの領域 (Framework ; FR1、FR2、FR3、FR4) を指す。換言すれば、例えばマウスモノクローナル抗体の超可変領域の相補性決定領域の一部又は全部以外の全ての領域が、ヒトイムノグロブリンの対応領域と置き換わったモノクローナル抗体を意味する。ヒトイムノグロブリンの対応領域由来の定常領域は、IgG、IgM、IgA、IgD及びIgE等のアイソタイプにより各々固有のアミノ酸配列を有するが、本発明におけるヒト型モノクローナル抗体の定常領域はいずれのアイソタイプに属するヒトイムノグロブリンの定常領域であってもよい。好ましくは、ヒトIgGの定常領域である。また、ヒトイムノグロブリン由来の可変領域の枠組領域についても限定されるものではない。

【0054】

本発明におけるヒト型モノクローナル抗体は、例えば以下のようにして製造することができる。しかしながら、そのような製造方法に限定されるものではないことは言うまでもない。例えば、マウスモノクローナル抗体に由来する組換えヒト型モノクローナル抗体は、特表平4-506458号公報及び特開平62-296890号公報等を参照して、遺伝子工学的に作製することができる。即ち、マウスモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマから、少なくとも1つのマウスH鎖CDR遺伝子と該マウスH鎖CDR遺伝子に対応する少なくとも1つのマウスL鎖CDR遺伝子を単離し、またヒトイムノグロブリン遺伝子から前記マウスH鎖CDRに対応するヒトH鎖CDR以外の全領域をコードするヒトH鎖遺伝子と、全マウスL鎖CDRに対応するヒトL鎖CDR以外の全領域をコードするヒトL鎖遺伝子を単離する。

【0055】

単離した該マウスH鎖CDR遺伝子と該ヒトH鎖遺伝子を発現可能なように適当な発現ベクターに導入し、同様に該マウスH鎖CDR遺伝子と該ヒトL鎖遺伝子を発現可能なように適当なもう1つの発現ベクターに導入する。または、該マウスH鎖CDR遺伝子／ヒトH鎖遺伝子とマウスヒトL鎖CDR遺伝子／ヒトL鎖遺伝子を同一の発現ベクターに発現可能なように導入することもできる。このようにして作製された発現ベクターで宿主細胞を形質転換することによりヒト型モノクローナル抗体産生形質転換細胞を得、該形質転換細胞を培養することにより培養上清中から目的のヒト型モノクローナル抗体を得る。

【0056】

本発明における「ヒト抗体」とは、イムノグロブリンを構成するH鎖の可変領域及びH鎖の定常領域並びにL鎖の可変領域及びL鎖の定常領域を含む全ての領域がヒトイムノグロブリンをコードする遺伝子に由来するイムノグロブリンである。ヒト抗体は、常法に従って、例えば少なくともヒトイムノグロブリン遺伝子をマウス等のヒト以外の哺乳動物の遺伝子座中に組込むことにより作製されたトランスジェニック動物を、抗原或いは免疫感作することにより、前述したポリクローナル抗体或いはモノクローナル抗体の作成法と同様にして製造することができる。例えば、ヒト抗体を産生するトランスジェニックマウスは、ネイチャージェネティックス (Nature Genetics)、第7巻、第13～21頁、1994年；特表平4-504365号公報；国際出願公開W094/25585号公報；日経サイエンス、6月号、第40～50頁、1995年；ネイチャー (Nature)、第368巻、第856～859頁、1994年及び特表平6-500233号公報に記載の方法に従って作製することができる。

【0057】

本発明において「抗体の一部」とは、少なくとも一つの可変領域を含有する抗体フラグメントの意であり、前述の本発明における抗体、好ましくはモノクローナル抗体の一部分の領域を意味し、具体的にはFv、F(ab')₂、Fab'あるいはFabを指す。ここで、「F(ab')₂」及び「Fab'」とは、イムノグロブリン（モノクローナル抗体）をタンパク質分解酵素であるペプシンあるいはパパイン等で処理す

ることにより製造され、ヒンジ領域中の2本のH鎖間に存在するジスルフィド結合の前後で消化されて生成される抗体フラグメントを意味する。例えば、IgGをパパインで処理すると、ヒンジ領域中の2本のH鎖間に存在するジスルフィド結合の上流で切断されてVL（L鎖可変領域）とCL（L鎖定常領域）からなるL鎖、及びVH（H鎖可変領域）とCH γ 1（H鎖定常領域中の γ 1領域）とからなるH鎖フラグメントがC末端領域でジスルフィド結合により結合した相同な2つの抗体フラグメントを製造することができる。これら2つの相同な抗体フラグメントをそれぞれFab'という。また、IgGをペプシンで処理すると、ヒンジ領域中の2本のH鎖間に存在するジスルフィド結合の下流で切断されて前記2つのFab'がヒンジ領域でつながったものよりやや大きい抗体フラグメントを製造することができる。この抗体フラグメントをF(ab')₂という。

【0058】

本発明はさらに、本発明の遺伝子またはDNA断片を含有する組み換えベクターを提供する。

組み換えベクターは、簡便には当業界において入手可能な組み換え用ベクター（例えば、プラスミドDNAなど）に所望の遺伝子を常法により連結することによって調製することができる。

用いられるベクターの具体例としては、大腸菌由来のプラスミドとしては、例えば、pBluescript、pUC18、pUC19、pBR322などが例示されるがこれらに限定されない。

【0059】

所望のタンパク質を生産する目的においては、特に、発現ベクターが有用である。発現ベクターの種類は、原核細胞および／または真核細胞の各種の宿主細胞中で所望の遺伝子を発現し、所望のタンパク質を生産する機能を有するものであれば特に限定されないが、例えば、大腸菌用発現ベクターとして、pQE-30、pQE-60、pMAL-C2、pMAL-p2、pSE420などが好ましく、酵母用発現ベクターとしてpYES2（サッカロマイセス属）、pPIC3.5K、pPIC9K、pA0815（以上ピキア属）、昆虫用発現ベクターとしてpBacPAK8/9、pBK283、pVL1392、pBlueBac4.5などが好ましい。

【0060】

プラスミドなどのベクターに本発明の遺伝子のDNA断片を組み込む方法としては、例えば、「Sambrook, J.ら, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, (second edition), Cold Spring Harbor Laboratory, 1.53(1989)」に記載の方法などが挙げられる。簡便には、市販のライゲーションキット（例えば、宝酒造製等）を用いることもできる。このようにして得られる組み換えベクター（例えば、組み換えプラスミド）は、以下に記載するような方法で宿主細胞に導入することができる。

【0061】

本発明の組み換えベクターを宿主細胞に導入（形質転換または形質移入）する方法としては、従来公知の方法を用いて行うことができ、例えば、「Sambrook, J.ら, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, (second edition), Cold Spring Harbor Laboratory, 1.74(1989)」に記載の塩化カルシウム法または塩化カルシウム／塩化ルビジウム法、エレクトロポレーション法、エレクトロインジェクション法、PEGなどの化学的な処理による方法、遺伝子銃などを用いる方法などが挙げられる。

【0062】

あるいはまた、例えば、宿主細胞が細菌（E.coil, Bacillus subtilis等）の場合は、例えばCohenらの方法 [Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 69, 2110(1972)]、プロトプラスト法 [Mol.Gen.Genet., 168, 111(1979)] やコンピテント法 [J.Mol.Biol., 56, 209(1971)] によって、Saccharomyces cerevisiaeの場合は、例えばHinnenらの方法 [Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 75, 1927(1978)] やリチウム法 [J.Bacteriol., 153, 163(1983)] によって、植物細胞の場合は、例えばリーフディスク法 [Science, 227, 129(1985)]、エレクトロポレーション法 [Nature, 319, 791(1986)] によって、動物細胞の場合は、例えばGrahamの方法 [Virology, 52, 456(1973)]、昆虫細胞の場合は、例えばSummersらの方法 [Mol.Cell.Biol., 3, 2156-2165(1983)] によってそれぞれ形質転換することができる。

【0063】

形質転換体を作成する際に使用する宿主細胞としては、本発明の組み換えベク

ターに適合し、形質転換され得るものであれば特に制限はなく、本発明の技術分野において通常使用される天然の細胞、または人工的に樹立された組み換え細胞など種々の細胞を用いることが可能である。例えば、細菌（エシェリキア属菌、バチルス属菌）などの原核細胞、酵母（サッカロマイセス属、ピキア属など）などの単細胞性宿主を含む下等真核性細胞、カイコなどの高等真核性細胞などが挙げられる。

【0064】

宿主細胞は、大腸菌、酵母、昆虫細胞などが好ましく、具体的には、大腸菌(M15、JM109、BL21等)、酵母(INVSc1(サッカロマイセス属)、GS115、KM71(以上ピキア属)など)、昆虫細胞(BmN4、カイコ幼虫など)などが例示される。また、動物細胞としてはマウス由来、アフリカツメガエル由来、ラット由来、ハムスター由来、サル由来またはヒト由来の細胞若しくはそれらの細胞から樹立した培養細胞株などが例示される。

【0065】

宿主細胞として細菌、特に大腸菌を用いる場合、一般に発現ベクターは少なくとも、プロモーター／オペレーター領域、開始コドン、所望のタンパク質をコードする遺伝子、終止コドン、ターミネーターおよび複製可能単位から構成される。

宿主細胞として酵母、植物細胞、動物細胞または昆虫細胞を用いる場合には、一般に発現ベクターは少なくとも、プロモーター、開始コドン、所望のタンパク質をコードする遺伝子、終止コドン、ターミネーターを含んでいることが好ましい。またシグナルペプチドをコードするDNA、エンハンサー配列、所望の遺伝子の5'側および3'側の非翻訳領域、選択マーカー領域または複製可能単位などを適宜含んでもよい。

【0066】

本発明のベクターにおいて、好適な開始コドンとしては、メチオニンコドン(ATG)が例示される。また、終止コドンとしては、常用の終止コドン(例えば、TAG、TGA、TAAなど)が例示される。

複製可能単位とは、宿主細胞中でその全DNA配列を複製することができる能

力をもつDNAを意味し、天然のプラスミド、人工的に修飾されたプラスミド（天然のプラスミドから調製されたプラスミド）および合成プラスミド等が含まれる。好適なプラスミドとしては、E.coilではプラスミドpQE30、pETまたはpCALもしくはそれらの人工的修飾物（pQE30、pETまたはpCALを適当な制限酵素で処理して得られるDNAフラグメント）が、酵母ではプラスミドpYES2もしくはpPIC9Kが、また昆虫細胞ではプラスミドpBacPAK8/9等があげられる。

【0067】

エンハンサー配列、ターミネーター配列については、例えば、それぞれSV40に由来するもの等、当業者において通常使用されるものを用いることができる。

選択マーカーとしては、通常使用されるものを常法により用いることができる。例えばテトラサイクリン、アンピシリン、またはカナマイシンもしくはネオマイシン、ハイグロマイシン、スペクチノマイシンまたはクロラムフェニコール等の抗生物質の耐性遺伝子などが例示される。

発現ベクターは、少なくとも、上述のプロモーター、開始コドン、所望のタンパク質をコードする遺伝子、終止コドン、およびターミネーター領域を連続的かつ環状に適当な複製可能単位に連結することによって調製することができる。またこの際、所望により制限酵素での消化やT4 DNAリガーゼを用いるライゲーション等の常法により適当なDNAフラグメント（例えば、リンカー、他の制限酵素部位など）を用いることができる。

【0068】

本発明の遺伝子がコードするタンパク質はG-CSF誘導刺激の入口として働いていることが考えられる（即ち、本発明は以下の理論により拘束されることはないものの、一つの可能性としては、マクロファージ細胞の表層に存在する本発明のタンパク質に外部からのリガンドが結合して、それにより生じたシグナルが細胞内に伝達されることにより当該マクロファージがG-CSFを放出するようになるというモデルが考えられる）。従って、本発明の遺伝子は、例えば、血液成分の白血球の一種である好中球が関与する疾患（例えば、好中球減少症など）の診断、予防および治療（遺伝子治療など）などに利用することが可能である。また、本発明のタンパク質またはその部分ペプチドは、血液あるいは骨髄中の好

中球の数を調整する医薬となり得る。

すなわち、本発明の遺伝子およびタンパク質は、抗ガン剤の副作用としての好中球減少症や骨髓移植後の好中球減少症の治療及び再生不良性貧血の診断、予防および治療などのために用いることが可能である。

本発明のタンパク質は通常、全身または局所的に、一般的には非経口の形で投与することができる。非経口投与の内でも特に好ましくは静脈内投与である。

本発明の遺伝子は、生体内あるいは生体外で細胞に遺伝子を導入するいわゆる遺伝子治療の形で全身または局所的に投与することができる。遺伝子導入は、例えばバイオマニュアルUPシリーズ、遺伝子治療の基礎技術、島田隆、斎藤泉、小澤敬也編：羊土社発行、1996年に記載の方法に従って行うことができる。生体外で細胞に導入する場合には、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクター、カチオニックリポソーム、HVJ-リポソームを用いる方法、リン酸カルシウム法、DEAEデキストラン法などを用いることができる。また、生体内で遺伝子を導入する場合には、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクター、カチオニックリポソーム、HVJ-リポソームを用いる方法を挙げることができる。

【0069】

投与量は、年齢、性別、体重、症状、治療効果、投与方法、処理時間、投与するもの(タンパク質または遺伝子の種類)などにより異なるが、成人一人当たり、一回につき $1\mu\text{g}$ から 100g の範囲、好ましくは $10\mu\text{g}$ から 1000mg の範囲で、一日一回から複数回非経口投与することができるだろう。投与量は種々の条件により変動するため、上記投与量より少ない量で十分な場合もあり、また上記の範囲を越える投与量が必要な場合もある。本発明による非経口投与のための注射剤としては、無菌の水性または非水性の溶液剤、懸濁剤、乳濁剤などを包含する。水性または非水性の溶液剤、懸濁剤としては、一つまたはそれ以上の活性物質が、少なくとも一つの不活性な希釈剤として混合される。水性の希釈剤としては、例えば注射用蒸留水および生理食塩水などが挙げられる。非水性の希釈剤としては、例えばプロピレングリコール、ポリエチレングリコール、オリーブ油の

ような植物油、エタノールのようなアルコール類などが挙げられる。

このような組成物は、さらに防腐剤、湿潤剤、乳化剤、分散剤、安定化剤（例えばアルギニン、アスパラギン酸など）のような補助剤を含んでいてもよい。

【0070】

これらはバクテリア保留フィルターを通す濾過、殺菌剤の配合または照射によって無菌化される。これらはまた無菌の固体組成物を例えば凍結乾燥法などによって製造し、使用前に無菌の注射用蒸留水または他の溶媒に溶解して使用することもできる。

非経口投与のためのその他の組成物としては、一つまたはそれ以上の活性物質を含み、常法により処方される外用液剤、腸溶内投与のための坐剤およびペッサリーなどが含まれる。

以下、本発明を実施例によりさらに詳細に説明するが、本発明はこれら実施例に制限されるものではない。

【0071】

【実施例】

実施例 1：マクロファージ細胞株よりモノクローナル抗体の認識する抗原遺伝子のクローニング

(1) マクロファージ細胞 (RAW264.7) からのポリ A⁺RNA の調製

2 × 10⁸ 個のマウスマクロファージ細胞 (RAW264.7) から、グアニジウムチオシアネート/フェノールクロロホルム・シングルステップ抽出法 (ラボマニュアル遺伝子工学、第3版、第83～84頁、1996) によって、約 0.3 mg の全 RNA を調製した。これをさらにオリゴ (dT) セルロースカラムを用いて精製して、5 μg のポリ A⁺RNA を得た。

【0072】

(2) ポリ A⁺RNA からの二本鎖 cDNA の合成

上記 (1) で得たポリ A⁺RNA (5 μg)、逆転写酵素 (MMLV-RTase; STRATAGENE 社製; 70 units)、dNTPs (0.6 mM) を含む反応液 (50 μl) を 37℃ にて 60 分間インキュベートすることによって、第 1 鎖 (first strand) cDNA を合成した。さらに、上記反応液 (45 μl)、D

NAポリメラーゼ (STRATAGENE社製; 100 units)、dNTPs (0.3 mM) を含む反応液を、16℃にて150分間インキュベートすることによって第2鎖 (second strand) を合成し、二本鎖cDNA (8 µg) を得た。

【0073】

(3) cDNAライブラリーの構築

Gubler-Hoffmannの方法 (Gubler, U. 及び Hoffmann, B., J.: Gene, 25: 263-269, 1983) によって、PfuDNAポリメラーゼを用いて、上記(2)で合成された二本鎖cDNAを平滑末端化し、T4DNAリガーゼによってアダプターを連結した。具体的には、上記(2)で得た二本鎖cDNA (DNA量 8 µg; 200 µl)、PfuDNAポリメラーゼ (5 units) を含む反応液 (全量 225 µl) を72℃で30分間インキュベートした。

アダプターを連結したDNAを制限酵素XhoIにより末端を切断し、ゲルカラムにより0.5 kbp以上の長さのcDNAを分画した。このcDNAを常法によりT4DNAリガーゼによってλZAPIIファージベクター (Stratagene社) に組込み、ファージ粒子内にパッケージングした。ファージの力価を測定した結果、このcDNAライブラリーは 1.2×10^6 個の独立したクローンを含むことが確認された。得られたファージライブラリーを大腸菌 (XL1-Blue MRF') に感染、増殖させて、 3.4×10^9 pfu/mlになるまで増殖させた。

【0074】

(4) 顆粒球コロニー刺激因子の誘導能を持つ抗体と結合性を有するタンパク質をコードする遺伝子のスクリーニング

上記(3)で構築したcDNAライブラリーに対して、顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF) の誘導能を持つモノクローナル抗体 (寄託番号 FERM BP-6103 を有するハイブリドーマが産生するもの; 特願平9-266591号明細書に記載) をプローブとしてイムノスクリーニングを行った。具体的手順は以下の通りである。

【0075】

ファージcDNAライブラリーを大腸菌 (XL1-Blue MRF') に感染させて、直径150 mmのプレートに播種した。42℃で4時間インキュベート

し、直径0.5mm程のプラークになるまで放置した。10mMのIPTG（イソプロピルチオ-β-ガラクトシド）に浸して風乾しておいたニトロセルロース膜をのせ、37℃に移して、3時間保温した。ニトロセルロース膜を剥がし、5%のスキムミルクを含むTBS-T（20mMトリス塩酸、pH7.6、0.1%Tween20）を用いて、室温で振盪しながら1時間インキュベートして、膜をブロッキングした。その後、TBS-Tで2分間軽く膜をリンスし（2回繰返す）、室温で15分間（1回）、5分間（2回）それぞれバッファーに浸して、洗浄した。1%BSA（bovine serum albumin）を含むTBSにより1.6μg/mlになるまで抗体（寄託番号FERM BP-6103を有するハイブリドーマが産生するもの）で希釈した。希釈した一次抗体溶液中で、ニトロセルロース膜を室温で振盪しながら、1時間インキュベートし、抗体と反応させた。先の洗浄条件と同様に、ニトロセルロース膜を洗浄した。1%BSAを含むTBSにより、アルカリホスファターゼ標識二次抗体（ZYMED）を0.6μg/mlになるまで希釈した。希釈した二次抗体溶液中で、ニトロセルロース膜を室温で振盪しながら1時間インキュベートし、抗体と反応させた。再度、上記の洗浄条件と同様にして、ニトロセルロース膜を十分に洗浄し、最後にTBS中で5分洗浄した。100mMのトリス塩酸（pH9.5）、100mMのNaClおよび5mMのMgCl₂の緩衝液中に1mlずつNBT溶液（ニトロブルー・テトラゾリウム50mg/ml in 70%ジメチルホルムアミド）とBCIP溶液（5-ブromo-4-クロロ-3-インドリルホスフェート50mg/ml in ジメチルホルムアミド）を加えてから、ニトロセルロース膜を浸した。暗所で30分間反応させ、膜を水で洗って乾燥させた。乾燥後、ニトロセルロース膜上で陽性反応を示したプラークを元のプレートから拾った。

その結果、一次スクリーニングでは 7×10^5 個のファージから9個の抗体結合陽性プラークを得た。陽性プラークを含むプラーク集団を回収し、増幅後、約1000個のファージから上記と同様の操作で二次スクリーニングを行った結果、3個の陽性クローン（MMR10、MMR17およびMMR19）が単離された。

【0076】

(5) 遺伝子の塩基配列の決定

上記(4)で得た3個の陽性クローン(MMR10、MMR17およびMMR19)について、常法に従いIn Vivo Excisionによって、 λ ZAP IIファージベクターから挿入DNAを切り出し、pBluescript SK(-)Phagemidに変換して、サブクローニングした。サブクローニングしたクローンは大腸菌(SOLR)中で大量に増殖して約20 μ gのプラスミドDNAを得た。Primer Walking法によって、これらのDNAの塩基配列を解析した。

塩基配列の解析の結果から、MMR19クローンはタンパク質のオープン・リーディング・フレームを含む840bpの完全長のcDNAの塩基配列を有することが判明した。MMR19クローンの塩基配列を配列表の配列番号1に記載する。

【0077】

(6) cDNAクローンの塩基配列から推定されるタンパク質の一次構造

上記(5)で解析した遺伝子の塩基配列から推定されるタンパク質(MMR-CAM)の一次構造(配列表の配列番号1に記載)は、241個のアミノ酸から構成され、アミノ酸配列から推定される分子量は約27kDaであった。MMR-CAMは、1カ所の膜貫通型領域を有するI型膜糖タンパク質であり、細胞外部分は107個、膜貫通部分は23個、細胞内部分は111個のアミノ酸からなると推定される。ホモロジー検索の結果、本発明のタンパク質と構造上類似した分子は特に認められず、本発明のタンパク質は既存のファミリーには属さないものと考えられる。また、細胞外領域には、O型糖鎖に豊富な修飾を受ける部分が存在した。細胞内領域には、プロテインキナーゼCやチロシンキナーゼなどのリン酸化部位が存在し、これらの糖鎖とリン酸化部位は、シグナル伝達に極めて重要な役割を担っているものと考えられる。

【0078】

実施例2：本発明のタンパク質(MMR-CAM)の発現

実施例1(4)で得たクローン(MMR19)を常法に従い、発現ベクター(λ ZAP II)中に挿入し、大腸菌(XL1-Blue)に形質転換し、形質転換体を構築した。形質転換された大腸菌を培養し、培養上清をドットプロットし、上記(3)で使用したのと同じモノクローナル抗体(寄託番号FERM B P-

6103を有するハイブリドーマが産生するもの) をプローブとして反応させた結果、培養上清中にこのモノクローナル抗体と結合するタンパク質が存在することが確認できた。

【0079】

実施例3：データベース検索によるマウス由来のタンパク質と他の相同タンパク質との比較

実施例1で決定された配列番号1記載の塩基配列およびアミノ酸配列について、データベース検索 (DNA DATA BANK of JAPAN (DDBJ)、日本DNAデータベース：文部省・国立遺伝学研究所・生命情報研究センター) により、ヒトにおける相同遺伝子の有無をアミノ酸レベルおよびDNAレベルの両方で検索した。得られた結果を以下の表1および表2に示す。この結果からは、本発明の遺伝子がヒトにおいても高い相同性ととも保存されていることが示唆される。

【0080】

【表1】

表1：アミノ酸レベルでの相同性

<u>配列表1に記載のアミノ酸配列における位置</u>	<u>ヒトホモログにおける同一性</u>
第1番目から第91番目	83/91 (91%)
第50番目から第146番目	83/97 (85%)
第1番目から第78番目	70/78 (89%)
第200番目から第241番目	40/42 (95%)
第172番目から第241番目	67/70 (95%)
第103番目から第150番目	46/48 (95%)
第169番目から第241番目	58/73 (79%)

【0081】

【表2】

表2：DNAレベルでの相同性

<u>配列表1に記載の塩基配列における位置</u>	<u>ヒトホモログにおける同一性</u>
第519番目から第736番目	189/218 (86%)
第666番目から第689番目	23/24 (95%)

第 381 番目から第 403 番目 22/23 (95%)

第 709 番目から第 727 番目 19/19 (100%)

【0082】

【発明の効果】

本発明の遺伝子およびそれがコードするタンパク質（上記遺伝子の断片および上記タンパク質の断片を含む）は新規であり、医薬用途として有用である。

また、本発明の遺伝子およびそれがコードするタンパク質は、顆粒球コロニー刺激因子の誘導能を有する物質（例えば、モノクローナル抗体、タンパク質、その他の低分子物質など）をスクリーニングする際の分析試薬としても有用である。

また、本発明の遺伝子の断片は、他の生物由来のホモログ遺伝子をスクリーニングする際のプローブとしても有用である。

【0083】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> JAPAN TOBACCO INC.

<120> A novel protein, a gene encoding it and use thereof

<130> 990626

<160> 1

【0084】

<210> 1

<211> 840

<212> DNA

<213> Mouse macrophage cell RAW 264.7

<400>

gaacc atg tct ggc tgt caa gct caa gga gac tgt tgc tcg cgg ccg tgt 50

Met Ser Gly Cys Gln Ala Gln Gly Asp Cys Cys Ser Arg Pro Cys

1	5	10	15	
ggc gcg cag gac aag gag cac ccc cga ttc ctg atc cca gaa ctt tgc				98
Gly Ala Gln Asp Lys Glu His Pro Arg Phe Leu Ile Pro Glu Leu Cys				
20	25	30		
aaa cag ttt tac cat ctg ggc tgg gtc act ggc act gga ggg gga atc				146
Lys Gln Phe Tyr His Leu Gly Trp Val Thr Gly Thr Gly Gly Gly Ile				
35	40	45		
agc ttg aag cat ggc aat gaa atc tac att gct ccc tca ggc gtg caa				194
Ser Leu Lys His Gly Asn Glu Ile Tyr Ile Ala Pro Ser Gly Val Gln				
50	55	60		
aag gag cgc att cag cca gaa gac atg ttt gtg tgt gac att aat gag				242
Lys Glu Arg Ile Gln Pro Glu Asp Met Phe Val Cys Asp Ile Asn Glu				
65	70	75		
cag gac ata agc ggc cct cca gca tct aag aag ctg aaa aaa agc cag				290
Gln Asp Ile Ser Gly Pro Pro Ala Ser Lys Lys Leu Lys Lys Ser Gln				
80	85	90	95	
tgc act cct ctt ttc atg aat gct tat acc atg aga gga gct ggc gca				338
Cys Thr Pro Leu Phe Met Asn Ala Tyr Thr Met Arg Gly Ala Gly Ala				
100	105	110		
gtg att cat acc cac tct aaa gct gct gtg atg gct acc ctt ctg ttt				386
Val Ile His Thr His Ser Lys Ala Ala Val Met Ala Thr Leu Leu Phe				
115	120	125		
cca gga cag gag ttt aaa att aca cat caa gag atg atc aaa gga ata				434
Pro Gly Gln Glu Phe Lys Ile Thr His Gln Glu Met Ile Lys Gly Ile				
130	135	140		
agg aaa tgt acc tca gga ggc tat tac aga tac gat gat atg tta gtg				482
Arg Lys Cys Thr Ser Gly Gly Tyr Tyr Arg Tyr Asp Asp Met Leu Val				
145	150	155		
gta cct att att gag aac act cct gaa gag aag gat ctc aaa gaa agg				530

Val Pro Ile Ile Glu Asn Thr Pro Glu Glu Lys Asp Leu Lys Glu Arg
 160 165 170 175
 atg gct cat gcc atg aat gag tac cca gac tcc tgt gcg gtt ctt gtc 578
 Met Ala His Ala Met Asn Glu Tyr Pro Asp Ser Cys Ala Val Leu Val
 180 185 190
 cgg cgt cat ggg gtg tac gtg tgg gga gaa aca tgg gag aaa gca aaa 626
 Arg Arg His Gly Val Tyr Val Trp Gly Glu Thr Trp Glu Lys Ala Lys
 195 200 205
 acc atg tgt gag tgt tat gac tac ctg ttt gac att gct gtc tcc atg 674
 Thr Met Cys Glu Cys Tyr Asp Tyr Leu Phe Asp Ile Ala Val Ser Met
 210 215 220
 aag aag atg gga ctc gat cca aca cag ctc cca gtt gga gaa aat gga 722
 Lys Lys Met Gly Leu Asp Pro Thr Gln Leu Pro Val Gly Glu Asn Gly
 225 230 235
 att gtg taa gccaaagtga tgcctaagca tctccaacaa taaaacaaac tcaattatgc 781
 Ile Val
 240
 cttaaataaa actcagctgc ttttaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 840

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 G-CSF誘導抗体の認識する抗原を特定すること。

【解決手段】 (a) 配列表の配列番号 1 に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質；

(b) 配列表の配列番号 1 において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換、付加若しくは挿入されたアミノ酸配列を有し、かつ顆粒球コロニー刺激因子誘導活性を有する抗体またはその一部と結合性を有するタンパク質；または

(c) 配列表の配列番号 1 に記載のアミノ酸配列と少なくとも 50%以上の相同性を有し、かつ顆粒球コロニー刺激因子誘導活性を有する抗体またはその一部と結合性を有するタンパク質；

をコードする遺伝子。

【選択図】 なし

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[000004569]

1. 変更年月日 1995年 5月16日

[変更理由] 住所変更

住 所 東京都港区虎ノ門二丁目2番1号

氏 名 日本たばこ産業株式会社